

高效降解 PCBs 的优势菌种选育研究

李 爽 ,张兰英 ,赵 喆 ,马会强 ,宗 芳 ,马 莉

(吉林大学环境与资源学院 ,吉林 长春 130026)

摘要 :以 PCBs 为目标污染物 ,筛选出具有高效降解能力的优势菌株 P1 和 P2 ,通过 16SrDNA 序列的测定和同源性比较分析 ,分别将其鉴定为产碱菌属(*Alcaligenes sp.*)和芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*) ,并通过驯化提高其降解能力。通过实验研究生长条件对 PCBs 去除效果的影响。实验得出最佳降解条件 :温度为 30℃ ,pH 值为 7 ,菌体接种量为 5 mL。7 d 的降解率最高可达 98.2%。

关键词 :PCBs ;菌种 ;选育 ;生物降解 ;降解特性

中图分类号 :X703 文献标识码 :A 文章编号 :1004-693X(2007)05-0047-03

Breeding of dominant strains for high-effective degradation of polychlorinated biphenyls

LI Shuang , ZHANG Lan-ying , ZHAO Zhe , MA Hui-qiang , ZONG Fang , MA Li

(College of Environment and Resources , Jilin University , Changchun 130026 , China)

Abstract Through isolating and purifying , the dominant strains P1 and P2 for high-effective degradation of PCBs were successfully identified as *Alcaligenes sp.* and *Bacillus sp.* respectively according to the measurement and homology analysis of their 16SrDNA sequences. By acclimation , their degradation capabilities were enhanced. The effects of growth conditions on the removal efficiency of PCBs were studied by experiment , and the best conditions were 30℃ , pH = 7 , and 5 mL of inoculation amount. The degradation ratio could reach 98.2% after 7 days.

Key words PCBs ; strain ; breeding ; biodegradation ; degradation characteristic

多氯联苯(Polychlorinated Biphenyls ,简称 PCBs)系一组化学性质极其稳定的氯代烃类化合物。因其具有良好的抗热性、不可燃性、低蒸气压和高介电常数等物理特性而被广泛应用于许多行业中。PCBs 进入土壤水环境中可通过食物链对生物体产生影响 ,对人类健康危害极大^[1]。虽然目前各国已普遍减少使用或停止生产 PCBs ,但其在土壤中的残存部分已经造成了大范围的污染。

由于 PCBs 具有高度持久性、半挥发性、生物积累性和高毒性 ,因此被列入 POPs 的首批行动计划名单^[2]。在对土壤水环境中的 PCBs 处理方面 ,微生物法是一种经济、环保的方法。但目前国内外的研究表明 ,筛选出的菌种只能以较慢的速度降解含 PCBs 浓度较低的废物和废水 ,且高效降解菌的筛选尚未有重

大进展 ,存在筛选出的菌种少、效率低等问题^[3-5]。

本文以 PCBs 为目标污染物 ,筛选出具有高效降解能力的优势菌株 ,并对其进行了初步鉴定。通过实验研究了生长条件对菌体降解效果的影响。

1 材料与仪器设备

1.1 仪器设备

使用安捷伦气相色谱 GC689(美国制造) ,分光光度计(上海制造) ,生化培养箱(广东制造) ,手提式压力蒸汽灭菌器(上海制造) ,LD422A 医用离心机(北京制造) ,恒宇电热恒温培养箱(上海制造) ,OLYMPUSCH20 显微镜(日本制造) 等。

1.2 供试材料及培养基

利用变压器绝缘液体配制 PCBs 原溶液 ,通过气

基金项目 :国家 973 项目(2004CB418505)

作者简介 :李爽(1982—) ,女 ,辽宁铁岭人 ,硕士研究生 ,研究方向为环境生物技术。E-mail :lishuang0624@126.com

通讯作者 :张兰英 ,教授 ,博士生导师 ,E-mail :zhangly@jlu.edu.cn

相色谱检测其质量浓度为 187.5 mg/L。

富集培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 5.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水 1 L。

基础培养基: NH_4NO_3 为 1 g, KCl 为 0.7 g, KH_2PO_4 为 2 g, Na_2HPO_4 为 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 0.7 g, CaCl_2 为 0.02 g, NaCl 为 1 g, 蒸馏水为 1 L, pH 值为 7.2~7.4, PCBs 按需要量加入。

1.3 试剂

采用 PCBs1260 标准品(纯度为 99.99%), *Taq* DNA 聚合酶, 正己烷(AR), HCl , NaOH , 牛肉膏, 蛋白胨, NaCl 。

2 实验方法

2.1 菌种的筛选

利用从受 PCBs 污染的土壤中筛选得到的菌株及净水菌剂进行降解效果实验, 实验菌株包括: 1 号菌(铜绿假单胞菌), 2 号菌(洋葱伯克霍尔德菌), 3 号菌(烟曲霉菌), 4 号菌(净水菌剂)。分别将菌体接入富集培养基, 培养 1 d 后转接入 150 mL 含有等量 PCBs 溶液的基础培养基, 用 PCBs 空白溶液作对照, 进行摇床培养(30℃, 120 r/min)。4 d 后取出, 离心 20 min, 取上层清液 20 mL 于干燥的分液漏斗中, 加入 5 mL 正己烷萃取, 经萃取的有机相液体进气相色谱检测^[7-8]。

根据检测结果, 筛选出降解效果最好的菌株 4 号菌, 通过逐渐增加培养基中 PCBs 含量对其进行驯化, 经 30 d 驯化得到高效降解 PCBs 的菌株, 对其进行进一步纯化, 划线分离得到两种单一菌株, 命名为 P1 和 P2。分别对 P1、P2 和二者的混菌进行降解效果实验, 确定混菌为后续实验所用菌株。

2.2 菌株的16SrDNA扩增和序列测定^[6]

以 P1 和 P2 菌体作为模板, 利用通用引物: F27(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和 R1492(5'-TACCTGTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。反应体系: 10 × buffer, 2.5 μL (含 20 mmol/L 的 Mg^{2+}); dNTP, 0.5 μL (10 mmol/L); *Taq* 聚合酶, 1.25 μL; 模板, 1.0 μL; 引物, 1.0 μL; 超纯水, 18.75 μL。反应条件: 90℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 40℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 经 45 次循环后, 72℃保温 10 min。16SrDNA 序列测定由上海生物工程公司完成。

2.3 菌体生长曲线的测定

将菌体接入基础培养基, 置于摇床中(30℃, 120 r/min)进行摇瓶培养, 在不同培养时间取菌液, 测定培养基光密度, 绘制生长曲线。

2.4 影响降解效果的因素分析

2.4.1 pH 值对去除效果的影响

将培养 32 h 的菌体 3 mL 分别等量接入到 6 个

含有 150 mL 基础培养基的三角瓶中(其中 PCBs 为 2 mL), 调节 pH 值为 5、6、6.5、7、7.5、8, 在相同条件下进行摇瓶培养(30℃, 120 r/min), 检测 1 d、2 d、3 d、5 d、7 d 的 PCBs 残留量。

2.4.2 温度对去除效果的影响

将培养 32 h 的菌体 5 mL 分别接入到 6 个含有 150 mL 基础培养基的三角瓶中(含 PCBs 原溶液 2 mL), 分别在 7℃、15℃、20℃、25℃、30℃条件下进行降解实验, 检测 1 d、2 d、3 d、5 d、7 d 的 PCBs 残留量。

2.4.3 菌体接种量对去除效果的影响

将培养 32 h 的菌液分别量取 3 mL、5 mL、7 mL、9 mL、11 mL(菌液浓度为 1.5×10^9 个/mL)接入至 6 个含有 150 mL 基础培养基的三角瓶中(其中 PCBs 原溶液为 2 mL), 将 pH 值和温度调节到最佳值进行培养, 检测 1 d、2 d、3 d、5 d、7 d 的 PCBs 残留量。

2.5 PCBs 浓度的测定

萃取后的待测液进气相色谱测定。
气相色谱测试条件: FID 检测器, HP7683 自动进样器进样体积为 1 μL, 采用恒流方式进样, 进样口温度为 250℃。柱流量为 2.0 mL/min。炉温采用程序升温方式, 初始温度 150℃, 保持 1 min, 以 3℃/min 的速度升至 270℃, 保持 2 min, 再以 20℃/min 的速度升至 280℃, 保持 10 min。载气为高纯氮气。

3 结果与讨论

3.1 菌落形态观察及鉴定

经观察, P1 菌落形态(平皿培养 24 h): 黄白色、半透明、圆形、直径 4.5~6.5 mm、表面光滑圆润、边缘不整齐。P2 菌落形态(平皿培养 24 h): 黄白色、不透明、圆形、直径 6~8 mm、表面光滑湿润、中间隆起、边缘整齐。

严格按照显微镜操作方法, 经染色观察, P1 为球菌, P2 为短杆菌, 菌体形态如图 1 所示。

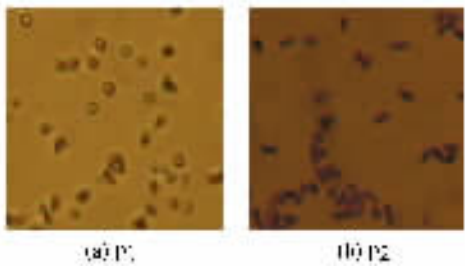


图 1 P1、P2 菌落的形态特征

经革兰氏染色观察到: P1 和 P2 均为革兰氏阴性菌。

扩增菌株的 16SrDNA 全长基因, 序列测定后在 GenBank 进行网上同源性的比对分析, 发现 P1 菌株与产碱菌属内的多种菌的 16SrDNA 一致性达到 99%, P2 与芽孢杆菌属的多种菌的 16SrDNA 一致性达到 98%。

通过此保守序列与 NCBI 中入库的 16SrDNA 的比较结果可知 ,P1 菌株属于产碱菌属(*Alcaligenes sp.*) ,P2 菌株属于芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)

3.2 生长曲线的测定

经测定 ,混菌的生长曲线存在 4 个时期(图 2): ①迟缓期 0~2 h ②对数期 4~32 h ③稳定期 32~48 h , ④衰老期 48 h 以后。由图 2 看出 32 h 基本达到了对数生长期的末期 故在以后的试验中培养时间都取 32 h。

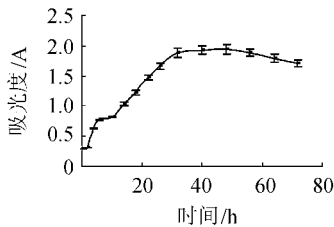


图 2 菌体生长曲线

3.3 pH 值对去除效果的影响

每种微生物都有其最适的 pH 值生长范围 ,不同 pH 值条件下菌体对 PCBs 的去除效果如图 3 所示。

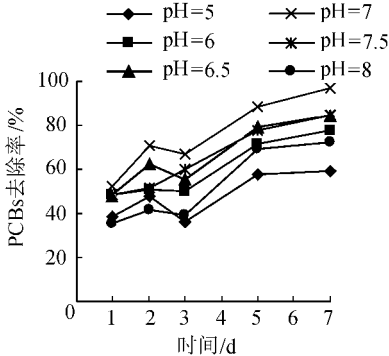


图 3 pH 值对 PCBs 去除效果的影响

由图 3 可知 :pH 值在 5~8 之间 ,菌体对 PCBs 均有一定的去除效果。但大体趋势均呈现出第 2 天的 PCBs 去除率稍高于第 3 天 ,即第 3 天 PCBs 含量有所增加。分析原因可能为菌体对有机物的吸附所致^[9]。即开始的两天由于菌体自身生理特征吸附了部分 PCBs ,而菌体经离心将 PCBs 带走。随时间增加 ,后 3 天的 PCBs 去除率逐渐升高 ,判断得出菌体对 PCBs 的降解作用起主导。

从图 3 可知 ,当 pH 值为 7 时 ,PCBs 去除率最高。随 pH 值的下降 ,菌液中氢离子数量增加 ,使得菌体的生长受到抑制 ,脱氯速度降低 ,而当溶液呈碱性 ,菌体生长同样受到抑制 因此导致 PCBs 去除率降低。

3.4 温度对去除效果的影响

温度是菌体生长受制因素之一 ,不同温度下菌体去除 PCBs 的实验结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出 ,随温度上升菌体的生长状况逐渐完善 ,当温度达到 30℃ 时 ,7 d 去除率达到 97.86%。同时发现 ,在菌体生长状况良好情况下 (温度在 20~30℃ 之间) ,前两天的 PCBs 去除率相

差不多。这是由于实验接种量相同 ,即单位体积培养基内菌体数量一致 ,而菌体的数量间接决定其所能吸附的 PCBs 含量 ,因此当菌体数量接近时导致测得的 PCBs 含量相差不多。

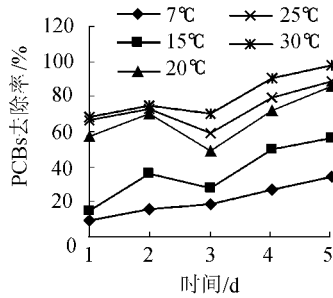


图 4 温度对 PCBs 去除效果的影响

3.5 接种量对去除效果的影响

将底物 pH 值调节至最佳值 7 ,温度调节至最佳值 30℃ ,通过改变菌体接种量进行去除效果实验 ,结果如图 5 所示。

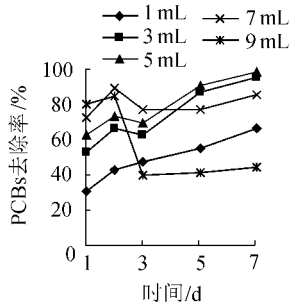


图 5 接种量对 PCBs 去除效果的影响

由图 5 可知 :当 pH 值和温度都选择最佳条件时 ,接种量为 5 mL 的去除效果最好。当接种量较小时 ,去除率随菌量增加而逐渐增大 ,但并非接种量越高去除效果越好 ,这是由于接种量过大时使细菌处于贫营养状态 ,生长代谢受到一定程度的限制 ,从而降低了降解速率^[10]。但同时可看出 ,当接种量过大时 ,PCBs 在开始的两天内去除率很高 ,到第 3 天之后去除率才明显降至较低水平 ,分析结果应该是由菌量的增加加剧了菌体的吸附功能 ,而使得测得的 PCBs 含量较低。由图 5 可知 ,当接种量为 5 mL 时 ,7 d 的去除率达到 98.2%。

4 结 论

通过 16SrDNA 序列的测定和同源性比较分析 ,将所得菌株 P1 鉴定为产碱菌属(*Alcaligenes sp.*) ,P2 鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)。经驯化后的菌体对 PCBs 去除效果较好。通过生长曲线的测定 ,确定最佳培养时间为 32 h。通过条件实验得出 :当温度保持在 30℃、pH 值为 7、菌体接种量为 5 mL 时 ,PCBs 降解效果最好 ,7 d 后 PCBs 的去除率最高达到 98.2%。

(下转第 54 页)

吸附到藻细胞表面 ,聚合物的数量、分子量、聚合物中正电荷密度影响混凝剂的除藻效率 ,混凝剂制备时应综合考虑以上因素。

致谢 :此研究得到哈尔滨工业大学马军教授的支持与指导 ,特此致谢 !

参考文献 :

[1] POURIS S. A fatal microcystin in intoxication in haemodialysis nmit in caruan[J]. Brazil Lancet ,1998 ,35(2) 21-26.
[2] CHENG WEN-po ,YU Ruey-fang ,CHI Chen-hsun. Influence of eutrophication on the coagulation efficiency in reservoir water

(上接第 40 页)

由以上计算结果可见 ,南宁污水处理厂全部投产运行后 ,各功能区的水环境容量 ,除邕江饮用、工业用水区的 C_0 因不受南宁市的排污影响而不变外 ,其他功能区的增加值均为正值 ,而且最小增加量为 235 t/a。

6 结 语

由以上分析计算结果可知 ,南宁市污水处理厂投入运行后 ,排入邕江的 COD 和 NH_3-N 比投产前分别减少了 86.2% 和 98.2% ;邕江的 COD 和 NH_3-N 的环境容量分别增加了 1 786 t/a、479 t/a。总之 ,南

(上接第 46 页)

参考文献 :

[1] 国家环境保护总局 . 2005 年中国环境状况公报[R]. 北京 :国家环境保护总局 ,2006 :27.
[2] 董士平 ,熊剑娟 ,龚效忠 ,等 . 聚合硫酸铁混凝剂的毒性测定[J]. 工业水处理 ,198(4) :55.
[3] 何铁林 . 水处理化学品手册[K]. 北京 :化学工业出版社 ,2000 :82-83.

(上接第 49 页)

参考文献 :

[1] 刘凌 ,崔广柏 ,郝振纯 . 多氯联苯在土壤水环境中生物降解过程规律研究[J]. 水利学报 ,200(6) 6-13.
[2] 吴文海 ,徐杰 . 多氯联苯降解方法研究进展[J]. 宁夏大学学报 :自然科学版 ,2001 ,22(2) 203-205.
[3] 贾凌云 ,付彦 ,杨凤林 . 生物降解多氯联苯的研究进展[J]. 现代化工 ,2002 ,22(增刊) 24-28.
[4] 吴春芳 ,吴星五 . 有机污染物的微生物处理研究进展[J]. 四川环境 ,2006 ,25(5) 71-80.
[5] 殷培杰 ,李培军 . 土壤和沉积物中多氯联苯污染的生物修复机理研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备 ,2005 ,6(1) :1-7.
[6] 张玉玲 ,张兰英 ,任何军 ,等 . 高产絮凝剂复合菌的基因

[J]. Chemospher ,2003 ,53(7) :773-778.
[3] 栾兆坤 ,汤鸿霄 . 聚合铝形态分布特征及转化规律[J]. 环境科学学报 ,1988 ,8(2) :146-155.
[4] 周群英 ,高廷耀 . 环境工程微生物学[M]. 北京 :高等教育出版社 ,2002 :324-326.
[5] 和彦苓 . 铭天青 S—溴化十六烷基三甲胺分光光度法测定水中钼[J]. 中国卫生检验杂志 ,2000 ,10(4) :431-432.
[6] 赵华章 ,杨宏伟 ,蒋展鹏 ,等 . 混凝沉淀过程中铝系混凝剂的形态转化规律[J]. 中国环境科学 ,2005 ,25(2) :183-187.
[7] 王志红 ,崔福义 . 混凝-沉淀工艺对残余铝去除的影响[J]. 水处理技术 ,2005 ,31(7) 69-72.

(收稿日期 2007-02-04 编辑 :高渭文)

宁市污水处理厂全部投入运行后 ,邕江的水质将得到明显的改善。

参考文献 :

[1] 方子云 . 水资源保护工作手册[K]. 南京 :河海大学出版社 ,1988 :435-436.
[2] 广西南宁市水利局 ,广西水文水资源南宁分局 . 邕江水域纳污能力分析计算[R]. 2005 :30-35.
[3] 袁弘任 ,魏开涓 ,吴国平 . 水资源保护管理基础[M]. 北京 :中国水利水电出版社 ,1996 :104-108.
[4] 广西壮族自治区水利厅 . 广西壮族自治区水功能区划研究[R]. 南宁 :广西壮族自治区水利厅 ,2002 :150-151.

(收稿日期 2006-03-21 编辑 :徐 娟)

[4] 张景宏 ,陆书凯 ,陈宗仁 . 用化学法处理屠宰污水的试验研究[J]. 工业水处理 ,1988 ,8(2) 39.
[5] 李亚峰 ,陈思荣 . 混凝沉淀法处理屠宰废水的试验研究[J]. 化工给排水设计 ,199(4) :15.
[6] 常青 . 水处理絮凝学[M]. 北京 :化学工业出版社 ,2003 :52-53.
[7] 王占生 ,刘文君 . 微污染水源饮用水处理[M]. 北京 :中国建筑工业出版社 ,1999 :57-58.

(收稿日期 2006-11-30 编辑 :高渭文)

分型及絮凝效果研究[J]. 中国给水排水 ,2006 ,22(11) :36-44.

[7] BLANCHARD M ,TEIL M J ,OLLIVON D ,et al. Origin and distribution of polyaromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in urban effluents to wastewater treatment plants of the Paris area (France) [J]. Water Research ,2001 ,35(15) 3679-3687.
[8] 张景明 ,胡冠九 ,周春宏 ,等 . 多氯联苯的气相色谱/质谱/质谱(GC/MS/MS)法测定[J]. 中国环境监测 ,2003 ,19(3) 5-8.
[9] 杨琦 ,刘海珠 ,尚海涛 ,等 . 反硝化菌对萘的吸附实验研究[J]. 油气田地面工程 ,2006 ,25(3) 29.
[10] 房芳 ,张兰英 ,杨雪梅 ,等 . 双酚 A 高效降解菌的筛选与降解特性[J]. 吉林大学学报 :理学版 ,2005 ,43(6) :874-876.

(收稿日期 2006-09-13 编辑 :高渭文)